

Rec'd PCT/PTO 07 FEB 2005

PCT/JPC3/C8600 #3

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

07.07.03

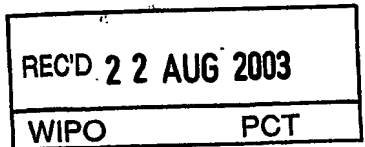
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年 8月 6日

出願番号  
Application Number: 特願2002-228705  
[ST. 10/C]: [JP 2002-228705]

出願人  
Applicant(s): 株式会社林原生物化学研究所

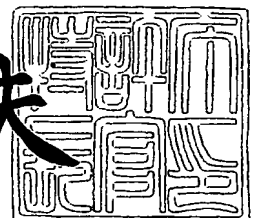


**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 10095901

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 C12P 19/18  
C07H 17/04  
C07D307/62  
C07B 63/00

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物  
化学研究所内

【氏名】 向井 和久

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物  
化学研究所内

【氏名】 津▲崎▼ 桂二

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物  
化学研究所内

【氏名】 久保田 倫夫

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物  
化学研究所内

【氏名】 福田 恵温

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物  
化学研究所内

【氏名】 三宅 俊雄

## 【特許出願人】

【識別番号】 000155908

【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所

【代表者】 林原 健

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 035736

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 L-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素または $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ（EC 2.4.1.19）とを作用させ、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成せしめ、これを採取することを特徴とする2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造方法。

【請求項2】  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素又は $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとを作用させた後に、グルコアミラーゼ（EC 3.2.1.3）を作用させることを特徴とする請求項1記載の2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造方法。

【請求項3】 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成せしめるに際し、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成しないか若しくはそれらの生成が検出できないほど少ないことを特徴とする請求項1又は2記載の2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造方法。

【請求項4】  $\alpha$ -グルコシル糖化合物が、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、シクロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉、及びグリコーゲンから選ばれる1種又は2種以上の糖質である請求項1、2又は3に記載の2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造方法。

【請求項5】 生成する2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸が、反応液固形物当り2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を10 w/w%以上含有し、且つ、反応液固形物当り5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-

L-アスコルビン酸を 0.1 w/w% 未満含有することを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造方法。

【請求項 6】 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を採取する工程に於いて、強酸性カチオン交換樹脂を用い、更に、必要に応じて、粉末化工程又は結晶化工程を含むことを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造方法。

【請求項 7】 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を採取する工程に於いて、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸をシラップ状、粉末状又は結晶状で採取することを特徴とする請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載の 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造方法。

【請求項 8】 L-アスコルビン酸と  $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素または  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとを作用させ、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成せしめる L-アスコルビン酸への糖転移方法。

【請求項 9】  $\alpha$ -グルコシル糖化合物が、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、シクロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉、及びグリコーゲンから選ばれる 1 種又は 2 種以上の糖質である請求項 8 記載の L-アスコルビン酸への糖転移方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造方法に関し、更に詳細には、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を用いて、又は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとを併用して糖転移反応せしめ、得られる糖転移物を含有する溶液からの 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製

造方法に関する。

【0002】

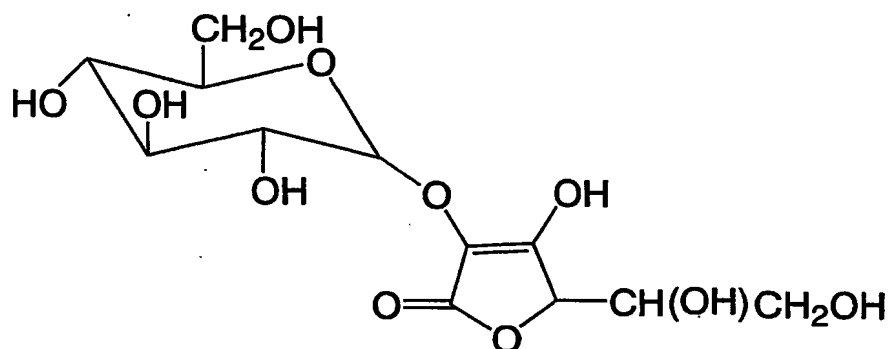
【従来の技術】

2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸は、特開平3-135992号公報、特開平3-139288号公報などに開示されているように、化学式1で示される化学構造を有しており、直接還元性を示さず、安定性に優れ、しかも生体内で容易に加水分解され、L-アスコルビン酸本来の生理活性を発揮するL-アスコルビン酸の糖誘導体である。

【0003】

【化1】

化学式1：



【0004】

その工業的製造方法としては、特開平3-183492号公報に開示されているように、例えば、L-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素または糖転移酵素とグルコアミラーゼ（EC 3.2.1.3）とを作用させて得られる2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸とともにそれ以外の夾雑物を含有する溶液を原料溶液として、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーを行ない、この溶出液の2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有画分を採取することにより、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有液を製造する方法、更に、これを濃縮して過飽和とし、結晶2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を製造する方法が開示されている。

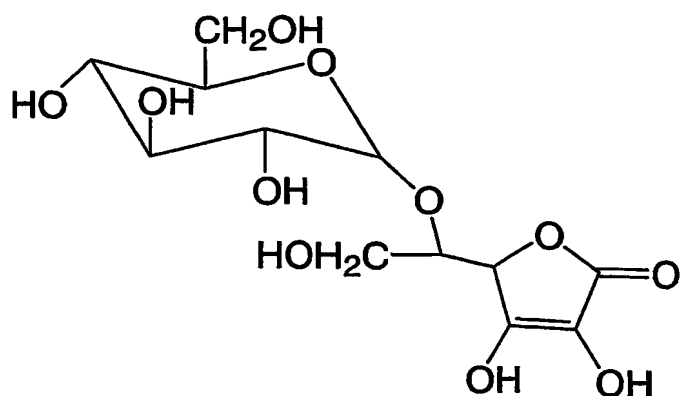
## 【0005】

しかしながら、糖転移酵素または糖転移酵素とグルコアミラーゼとを作用させて得られる L-アスコルビン酸糖誘導体は、例えば、糖転移酵素がシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ (EC 2. 4. 1. 19) (以下、本明細書では、CGTase と略することもある。) の場合には、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸以外に、副生成物として、その結合異性体である 5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸 (化学式 2) 及び 6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸 (化学式 3) が生成し、また、糖転移酵素が  $\alpha$ -グルコシダーゼ の場合には、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸以外に、6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸が生成することが知られている。強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーの際、原料溶液に含まれる L-アスコルビン酸やグルコースは 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸と分子量が異なるために 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸と分離が比較的容易であるが、一方、副生成物として生成した 5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び 6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸は 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸と分子量が同一であるために 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸と分離が困難であり、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有画分の純度向上を妨げ、更に、過飽和溶液からの結晶 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の析出をも阻害する。

## 【0006】

## 【化 2】

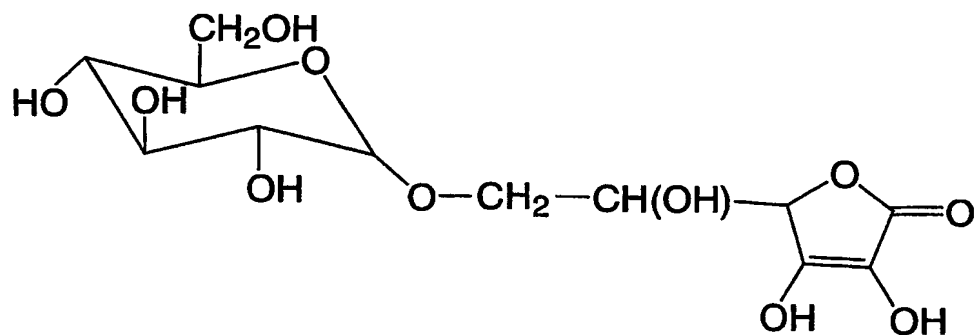
化学式 2 :



【0007】

【化3】

化学式3：



【0008】

更に、これら結合異性体である5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸は、結晶2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を分離除去した母液中に残存し、この母液からの更なる結晶2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の析出を阻害し、2番晶、3番晶の回収量を著しく低下させる。

【0009】

5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の除去方法としては、特開平5-117290号公報に開示されているように、これら結合異性体が直接還元性を有するため酸化されやすいという特性を利用して、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシ



ルーレーアスコルビン酸とともにこれら結合異性体とを含有する溶液を酸化処理して、直接還元性を示す結合異性体だけを酸化せしめ、次いで、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーを行なうことにより、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルルーレーアスコルビン酸とルーアスコルビン酸糖誘導体の酸化物（以下、単にルーアスコルビン酸糖誘導体酸化物と略称する。）とを分離し、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルルーレーアスコルビン酸高含有物を製造する方法が開示されている。

#### 【0010】

しかしながら、上記のようにして、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルルーレーアスコルビン酸とともにこれら直接還元性を示す結合異性体を含有する溶液を酸化処理するには、できるだけ、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルルーレーアスコルビン酸に作用することなく、直接還元性を示す結合異性体を優先的に酸化する条件が必要で、例えば、通気攪拌などの好氣的条件にさらす方法が採用され、この際、pHを弱酸性乃至アルカリ性にしたり、銅塩、鉄塩などの金属塩、水蒸気炭、塩化亜鉛炭などの活性炭など酸化促進剤を共存させたり、過酸化水素、過マンガン酸カリウムなどの酸化剤を添加するなど操作が煩雑で、また、酸化反応が不十分であれば、直接還元性を示す結合異性体が残存し、酸化反応が過度であれば、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルルーレーアスコルビン酸にまで作用が及び、結果として得られる2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルルーレーアスコルビン酸高含有物の収率が低下することとなるため、酸化反応の工程にはその適正な反応進行を維持するための正確な制御が必要で、それに掛かる経済的労力には多大なものがあつた。

#### 【0011】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記のような従来の2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルルーレーアスコルビン酸の製造方法の欠点を解消するために為されたもので、結合異性体を分離する必要がなく、効率良く2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルルーレーアスコルビン酸を製造することができる2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルルーレーアスコルビン酸の製造方法を提供するものである。

## 【0012】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者等は、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造において、その初発工程であるL-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素または糖転移酵素とグルコアミラーゼとを作用させる工程で得られる2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を含有する溶液中に夾雑物である5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成しないか、若しくは検出されないほど生成量が少なくすることができれば、これら直接還元性を示すL-アスコルビン酸糖誘導体を酸化処理するなどの除去工程を必要とすることなく、高純度の2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有物を工業的規模で高収率に製造できるのではないかと考え、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成しないか若しくはそれらの生成が検出できないほど少ない2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸生成反応の確立を目指して、研究を続けてきた。

## 【0013】

その結果、意外にも、L-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に、糖転移酵素として、先に発明した国際公開番号WO02/10361号明細書で開示した $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させることによって、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸が著量生成し、しかも、夾雑物である5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成しないか若しくはそれらの生成が検出できないほど少ないことを見いだした。

## 【0014】

更に、糖転移反応する際、該 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とCGTaseとを併用し糖転移反応を起こさせるか、又は、これら酵素の併用による糖転移反応を起こさせ、次いで、グルコアミラーゼを作用させることによって、得られる2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成量は、糖

転移酵素として  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を単独で使用する場合よりも増加し、しかも、その時の 5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び 6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸等の結合異性体は、糖転移酵素として  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を単独で使用する場合と同様に生成しないか若しくはそれらの生成が検出できないほど少ないことも判明した。

#### 【0015】

上記のような糖転移反応によって得られる 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を含有する糖転移反応生成物は、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーでは分離が困難であった 5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び 6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸等の結合異性体を含有していないか、若しくは含有していてもその量が極めて少ないため、該クロマトグラフィーによって目的とする 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸が容易に、且つ高収率で分離・精製でき、高純度の 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有物を工業的規模で高収率に製造できるものである。

#### 【0016】

また、このようにして得られる高純度の 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有物の過飽和溶液は、結晶の析出が容易で収率も高く、結晶 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の工業的製造方法としてきわめて有利であることが判明した。

#### 【0017】

本明細書でいう生成しないか若しくはそれらの生成が検出できないほど少ないとは、反応液固形物当り 0.1 w/w% (以下、本明細書では、特にことわらない限り、%は w/w% を意味する。) 未満の生成量を意味する。また、本明細書でいう直接還元性を示すとは、L-アスコルビン酸の場合と同様に、そのまま、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを還元脱色することを意味する。

#### 【0018】

また、本明細書でいう L-アスコルビン酸とは、L-アスコルビン酸のみならず、L-アスコルビン酸のアルカリ金属塩若しくはアルカリ土類金属塩などの L-アスコルビン酸塩、または、それらの混合物を意味する。

#### 【0019】

また、同様に、本明細書でいう 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸、6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸、 $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸などについても、特に不都合が生じない限り、遊離の酸のみならず、それらの塩をも意味する。

#### 【0020】

以下、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素による糖転移反応方法、または、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と CGTase との併用による糖転移方法について、より具体的に説明する。

#### 【0021】

本発明で用いる  $\alpha$ -グルコシル糖化合物は、 $\alpha$ -グルコースを有する化合物であり、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素単独、または、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と CGTase との併用によって、L-アスコルビン酸から 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸又は/及び 2-O- $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を生成できるものであればよく、例えば、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、マルトオクタオースなどのマルトオリゴ糖、マルトデキストリン、シクロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉、グリコーゲンなどが適宜選択できる。

#### 【0022】

反応時の L-アスコルビン酸の濃度は、通常、1%以上、望ましくは、約 2 乃至 30% (w/v) であればよく、 $\alpha$ -グルコシル糖化合物は、L-アスコルビン酸 1 重量部に対して、通常、約 0.5 乃至 30 重量部の範囲が好適である。

#### 【0023】

本発明に用いる  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、例えば、国際公開

番号WO02/10361号明細書に記載の如く、非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質に対して、該糖質から、還元力を実質的に増加することなく $\alpha$ -グルコシル転移することによって、非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する酵素活性を有しており、具体例としては、下記の理化学的性質を有する酵素がある。尚、前記非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質としては、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉及びグリコーゲンから選ばれる1種又は2種以上の糖質を例示できる。

#### (1) 作用

非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく $\alpha$ -グルコシル転移することによって、非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する

#### (2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約74,000乃至160,000ダルトンの範囲内で分子量を有する。

#### (3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.8乃至7.8の範囲内に等電点を有する。

#### (4) 至適温度

pH 6.0、60分間反応で、約40乃至50℃の範囲内で至適温度を有する。

pH 6.0、60分間反応で、1mM  $\text{Ca}^{2+}$ 存在下、約45乃至55℃の範囲内に至適温度を有する。

pH 8.4、60分間反応で、約60℃に至適温度を有する。または、

pH 8.4、60分間反応で1mM  $\text{Ca}^{2+}$ 存在下、約65℃に至適温度を有

する。

(5) 至適 pH

35℃、60分間反応で、pH約6.0乃至8.4の範囲内に至適pHを有する。

(6) 温度安定性

pH6.0、60分間保持する条件で、約45℃以下に温度安定域を有する。

pH6.0、60分間保持する条件で、1mM  $\text{Ca}^{2+}$ 存在下、約50℃以下に温度安定域を有する。

pH8.0、60分間保持する条件で、約55℃以下に温度安定域を有する。または、

pH8.0、60分間保持する条件で、1mM  $\text{Ca}^{2+}$ 存在下、約60℃以下に温度安定域を有する。

(7) pH安定性

4℃、24時間保持する条件で、pH約4.5乃至10.0の範囲内に安定pH域を有する。

(8) N末端アミノ酸配列

チロシンーバリンーセリンーセリンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーイソロイシン（配列表における配列番号1）、ヒスチジンーバリンーセリンーアラニンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーロイシン（配列表における配列番号2）、または、アラニンープロリンーロイシンーグリシンーバリンーグルタミンーアルギニンーアラニンーグルタミンーフェニルアラニンーグルタミンーセリンーグリシン（配列表における配列番号3）を有する場合がある。

【0024】

本発明に用いる $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、糖転移反応の供与体として、非還元性末端の結合様式が $\alpha$ -1, 4グルコシル結合であるグルコース重合度が2以上の糖質を用いると、L-アスコルビン酸に糖転移し2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸、及び、更にこの2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸のグルコピラノシル基に $\alpha$ -グルコピ

ラノシル残基が1個または2個以上転移した2-O- $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を生成する。

#### 【0025】

本発明に用いる $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素としては、例えば、アルスロバクター属及びバチルス属などに属する細菌由来の酵素があり、例えば、アルスロバクター・グロビホルミス (*Arthrobacter globiformis*) A19株 (FERM BP-7590)、バチルス・グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C9株 (FERM BP-7143)、バチルス・グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C11株 (FERM BP-7144)、バチルス・グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) N75株 (FERM BP-7590)などを挙げることができる。勿論、NTGなどの化学変異誘発剤または紫外線や照射線などを用いた人為的変異を施したり、突然変異株を分離して、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素高生産株などを取得し、その変異株由来の酵素も有利に利用できる。

#### 【0026】

また、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のポリペプチドをコードする遺伝子DNAを化学合成したり、本来、該遺伝子DNAを保有する細胞からクローニングしたりして該遺伝子DNAを得た後、該遺伝子DNAをそのまま、若しくは1個または2個以上のDNAを他のDNAに置換したり、1個または2個以上のDNAを欠失または付加、挿入して、同種または異種の細胞に導入し発現させた、所謂、セルフクローニング体及び組換え体の由来の酵素であってもよい。

#### 【0027】

本発明に用いるCGTaseは、例えば、バチルス (*Bacillus*) 属、クレブシーラ (*Klebsiella*) 属、サーモアナエロバクター (*Thermoanaerobacter*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、サーモコッカス (*Thermococcus*) 属などに属する細菌由来の酵素が適宜選択される。また、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の場合と同様に、CGTaseのポリペプチドをコードする遺伝子DNAを化

学合成したり、本来、該遺伝子DNAを保有する細胞からクローニングしたりして該遺伝子DNAを得た後、該遺伝子DNAをそのまま、若しくは1個または2個以上のDNAを他のDNAに置換したり、1個または2個以上のDNAを欠失または付加、挿入して、同種または異種の細胞に導入し発現させた、所謂、セルフクローニング体及び組換え体の由来の酵素であってもよい。

#### 【0028】

これら糖転移酵素は、必ずしも精製して使用する必要はなく、通常は、粗酵素で本発明の目的を達成することができる。必要ならば、公知の各種方法で精製して使用してもよい。

#### 【0029】

また、使用酵素量と反応時間とは、密接な関係があり、通常は、経済性の点から約3乃至80時間で反応を終了するように酵素量が選ばれる。

#### 【0030】

また、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とCGTaseとを併用して使用する場合、CGTaseの使用量が過剰であると、CGTaseの糖転移反応による副生成物である5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成量が著しく増加し、本発明の効果が発揮できなくなる。したがって、本発明に用いるCGTaseの量は、望ましくは、基質の $\alpha$ -グルコシル糖化合物1グラム当り約0.01乃至50単位の範囲から選択される。なお、ここでいうCGTaseの酵素活性を示す単位は、20mMの酢酸緩衝液(pH5.5)及び2mMの塩化カルシウムを含む0.3%(w/v)の澱粉溶液にCGTaseを添加し、40℃、10分間反応することで測定し、その酵素活性1単位は、15mgの溶液状澱粉のヨウ素呈色を完全に消失させる酵素量とする。

#### 【0031】

また、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とCGTaseとを別々の担体に固定化し、または、両酵素を同一の担体に固定化し、得られる固定化された糖転移酵素をバッチ式で繰り返し、または連続式で反応に利用することも有利に実施できる。



## 【0032】

本発明の糖転移方法は、通常、前述のL-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、または、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とCGTaseとを加え、該両酵素が充分作用する条件、望ましくは、pH約3乃至10、温度30乃至70℃の範囲から選ばれる反応条件にして行う。

## 【0033】

また、反応中にL-アスコルビン酸が酸化分解を受け易いので、できるだけ嫌気または還元状態で遮光下に維持するのが望ましく、必要ならば、チオ尿素、硫化水素などを共存させて反応させることも有利に実施できる。

## 【0034】

本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素単独、または、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とCGTaseとを併用して、L-アスコルビン酸に糖転移させると、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸が生成するとともに、 $\alpha$ -D-グルコピラノシル残基が更に1個又は2個以上付加した2-O- $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸も混在して生成する。

## 【0035】

以上述べたように、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素単独、または、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とCGTaseとの併用による糖転移反応を採用すると、L-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とから、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸が生成するとともに、 $\alpha$ -D-グルコピラノシル残基が更に1個又は2個以上付加した2-O- $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸も混在して生成するものの、工業的カラムクロマトグラフィーなどで分離困難な夾雑物である5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸などL-アスコルビン酸の5位水酸基への糖転移物や6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸などL-アスコルビン酸の6位水酸基への糖転移物の副生成は無いか検出できないほど少ない。

## 【0036】

本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素単独、または、 $\alpha$ -イソマル

トシルグルコ糖質生成酵素と CGTase との併用による糖転移反応によって得られる生成物にグルコアミラーゼを作用させると、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸より高分子の2-O- $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸のグリコシル部分の $\alpha$ -1, 4結合又は $\alpha$ -1, 6結合を加水分解し、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を蓄積生成させることができる。

#### 【0037】

グルコアミラーゼの作用条件は、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸より高分子の2-O- $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸を加水分解し、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を蓄積生成させることができる条件であればよく、反応pH、反応温度、作用量、作用時間など適当な条件で実施すればよい。また、担体結合法、架橋法、又は包括法などで固定化されたグルコアミラーゼを用いて連続式に、またはバッチ式にグルコアミラーゼ反応することも、反応後に膜分離などして、反応液とグルコアミラーゼとを別々に回収し、グルコアミラーゼを再利用することも有利に実施できる。

#### 【0038】

通常、反応溶液は加熱するなどして酵素を失活させた後、またはそのまま、活性炭で脱色し、濾過して不溶物を除き、必要であれば濃縮する。得られる2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸含有溶液は、目的とする2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸とともに、夾雑物として未反応のL-アスコルビン酸、D-グルコースなど中性糖質を含有している。グルコースなどの中性糖質を、公知の方法、例えば、電気透析法、アニオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィー法などで分離、除去、又は低減させてもよい。このようにして得られる2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸含有溶液を原料として、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーを行い、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有画分を得る。

#### 【0039】

強酸性カチオン樹脂は、公知の、例えば、スルホン酸基を結合したスチレンー

ジビニルベンゼン架橋共重合体樹脂の $\text{Na}^+$ 型、 $\text{K}^+$ 型などのアルカリ金属塩型、または、 $\text{Ca}^{++}$ 型、 $\text{Mg}^{++}$ 型などのアルカリ土類金属塩型、または $\text{H}^+$ 型などが適宜使用され、市販品としては、例えば、ダウケミカル社製造の商品名『ダウエックス 50W×8』、ローム&ハース社製造の商品名『アンバーライト CG-6000』、東京有機化学工業株式会社製造の商品名『XT-1022E』、三菱化学株式会社製造の商品名『ダイヤイオン SK104』などがある。

#### 【0040】

原料溶液として、例えば、目的とする $2\text{-O-}\alpha\text{-D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸}$ とともに、 $\text{L-アスコルビン酸}$ 、 $\text{D-グルコース}$ などの夾雑物を含有する溶液を用いる場合には、強酸性カチオン交換樹脂を充填したカラムに原料溶液を流し、次いで、水で溶出し、 $2\text{-O-}\alpha\text{-D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸}$ 高含有画分、 $2\text{-O-}\alpha\text{-D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸} \cdot \text{L-アスコルビン酸} \cdot \text{D-グルコース}$ 高含有画分、 $\text{L-アスコルビン酸} \cdot \text{D-グルコース}$ 高含有画分などの順に複数の画分に分画して、この $2\text{-O-}\alpha\text{-D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸}$ 高含有画分を採取することにより、容易に $2\text{-O-}\alpha\text{-D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸}$ 高含有物が製造される。

#### 【0041】

また、原料溶液をカラムに流して分画するに際し、既に得られている $2\text{-O-}\alpha\text{-D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸} \cdot \text{L-アスコルビン酸} \cdot \text{D-グルコース}$ 高含有画分などの $2\text{-O-}\alpha\text{-D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸}$ 含有画分を原料溶液の前後に、または、原料溶液とともに流すことにより、分画に要する水の使用量を減少させ、原料溶液から $2\text{-O-}\alpha\text{-D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸}$ 高含有物を高濃度、高収率で採取することも有利に実施できる。本発明で使用される分画方式は固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式のいずれであってもよい。

#### 【0042】

このようにして得られる本発明の $2\text{-O-}\alpha\text{-D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸}$ 高含有物、望ましくは、純度70%以上の高含有物は、溶液状であ

っても、また濃縮してシラップ状であっても、安定であり、その取り扱いが容易である。通常、更に濃縮して、過飽和溶液とし、結晶化して、さらに安定化した結晶 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を製造する。本発明で使用する晶出用 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有物は、結晶 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の析出を阻害する直接還元性を示す結合異性体を、初発の糖転移反応段階で実質的に含有していないので、その結晶の析出は、きわめて容易であり、結晶収率も高い。晶出方法は、通常、20乃至60℃の過飽和 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸溶液を助晶缶にとり、これに種結晶を望ましくは、0.1乃至2%共存せしめて、ゆっくり攪拌しつつ徐冷し、晶出を促してマスクットにすればよい。

#### 【0043】

このように、本発明の結晶 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸は、過飽和 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸溶液に結晶 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を種晶として加えることにより容易に晶出させることができる。

#### 【0044】

晶出したマスクットから結晶 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸粉末を製造する方法としては、結晶 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸粉末を採取できる方法を適宜選択すればよく、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法などが挙げられる。

#### 【0045】

このようにして得られる結晶 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸は、その純度、晶出率によって多少変動するものの、実質的に非吸湿性または、難吸湿性であり、その結晶粉末は流動性であり、固着の懸念もなく、その優れた特長は、次の通りである。

(1) 直接還元性を示さず、きわめて安定である。

L-アスコルビン酸とは違って、メイラード反応を起こしにくい。従って、アミノ酸、ペプチド、蛋白質、脂質、糖質、生理活性物質などが共存しても無用の反

応を起こさず、むしろ、これらの物質を安定化する。

(2) 加水分解を受けてL-アスコルビン酸を生成し、L-アスコルビン酸と同様の還元作用、抗酸化作用を示す。

(3) 体内の酵素により、L-アスコルビン酸とD-グルコースとに容易に加水分解され、L-アスコルビン酸本来の生理活性を示す。

また、ビタミンE、ビタミンPなどとの併用により、その生理活性を増強することができる。

(4) L-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを経口摂取することにより、生体内で生成され、代謝される物質であることから、その安全性は極めて高い。

(5) 実質的に、非吸湿性、難吸湿性であるにもかかわらず、水に対して大きな溶解速度、溶解度を有しており、粉末、顆粒、錠剤などのビタミン剤、サンドクリーム、チョコレート、チューインガム、即席ジュース、即席調味料などの飲食物のビタミンC強化剤、呈味改善剤、酸味剤、安定剤などとして有利に利用できる。

(6) 実質的に非吸湿性または難吸湿性であり、固結しないことからその粉末は流動性であり、その取り扱いが容易で非晶質の場合と比較して、その包装、輸送、貯蔵に要する物的、人的経費が大幅に削減できる。

#### 【0046】

次に実験により本発明のL-アスコルビン酸への糖転移方法をさらに具体的に説明する。

#### 【0047】

##### 【実験1】

〈 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の生産〉

澱粉部分分解物『パインデックス#4』4.0% (w/v)、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8% (w/v)、リン酸二カリウム0.1% (w/v)、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06% (w/v)、硫酸マグネシウム・7水塩0.05% (w/v)、及び水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して

、アルスロバクター・グロビホルミス A19 株 (FERM BP-7590) を接種し、27℃、230 rpm で 48 時間回転振盪培養したものを種培養とした。容量 30 L のファーメンターに種培養の場合と同組成の培地を約 20 L 入れて、加熱滅菌、冷却して温度 27℃ とした後、種培養液 1% (v/v) を接種し、温度 27℃、pH 6.0 乃至 9.0 に保ちつつ、48 時間通気攪拌培養した。培養後、培養物中の酵素活性を測定したところ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約 1.1 単位/ml であった。この培養物を遠心分離 (10,000 rpm、30 分間) して回収した上清約 18 L の酵素活性を測定したところ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約 1.06 単位/ml (総活性約 19,100 単位) であった。

#### 【0048】

尚、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性測定は、次のようにして測定する。マルトトリオースを濃度 2 w/v % となるよう 100 mM グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 8.4) に溶解させ基質液とし、その基質液 0.5 ml に酵素液 0.5 ml 加えて、40℃ で 60 分間酵素反応し、その反応液を 10 分間煮沸して反応を停止させた後、その反応液中のマルトース含量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法で定量することによって行った。 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性 1 単位は、上記の条件下で 1 分間に 1  $\mu$  モルのマルトースを生成する酵素量と定義した。尚、HPLC は、『Shodex KS-801 カラム』 (昭和電工株式会社製造) を用い、カラム温度 60℃、溶離液として水の流速 0.5 ml/min 水の条件で行い、検出は示差屈折計『RI-8012』 (東ソー株式会社製造) を用いて行なった。

#### 【0049】

##### 【実験 2】

〈 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製〉

実験 1 の方法で得た培養上清約 18 L を 80% 飽和硫酸液で塩析して 4℃、24 時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離 (10,000 rpm、30 分間) して回収し 10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約 850 ml を得た。この粗酵素液は、 $\alpha$ -イソマルト

シルグルコ糖質生成酵素活性を約 8、210 単位含んでいた。この粗酵素液を『DEAE-トヨパール (Toyoparl) 650S』ゲル (東ソー株式会社製造) を用いたイオン交換クロマトグラフィー (ゲル量 380 ml) に供した。酵素活性成分は、『DEAE-トヨパール (Toyoparl) 650S』ゲルには吸着し、NaCl 濃度 0 M から 1 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性成分は、NaCl のリニアグラジエントでその濃度が約 0.2 M 付近で溶出した。そこで、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分を回収し、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する部分精製酵素標品を回収した。

#### 【0050】

得られた  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する部分精製酵素標品を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、この透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲル (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製造) を用いたアフィニティークロマトグラフィー (ゲル量 500 ml) に供した。酵素活性成分は、『セファクリル (Sephacryl HR S-200)』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M に濃度低下するリニアグラジエントで溶出させたところ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、硫酸のリニアグラジエント濃度が約 0.2 M 付近の画分に検出された。そこで、本酵素活性画分を回収し、精製酵素標品とした。この精製の各ステップにおける  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する酵素標品の酵素活性量、比活性、収率を表 1 に示す。

#### 【0051】

【表 1】

酵 素	酵素量 (単位/g)	生成量(%)		
		2-O- $\alpha$ -D-グル コピラノシル- $\alpha$ - アスコルビン酸	5-O- $\alpha$ -D-グル コピラノシル- $\alpha$ - アスコルビン酸	6-O- $\alpha$ -D-グル コピラノシル- $\alpha$ - アスコルビン酸
アルスロバクター 属由来 $\alpha$ -イソマル トシルグルコ糖 質生成酵素	5	22.5	0.0	0.0
	10	24.0	0.0	0.0
	20	24.3	0.0	0.0
シクロマルトデキ ストリン・グルカノ トランスフェラーゼ (CGTase: 対照)	300	25.5	0.8	0.3

## 【0052】

精製した  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を 7.5% (w/v) 濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い酵素標品であった。

## 【0053】

## 【実験3】

<  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の諸性質 >

## 【0054】

## 【実験3-1】

< 分子量 >

実験2の方法で精製して得た  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (ゲル濃度 7.5 w/v %) に供し、同時に泳動した分子量マーカー (日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製造) と比較して当該酵素の分子量を測定した。当該酵素の分子量は約 94,000  $\pm$  20,000 ダルトンであった。

## 【0055】

## 【実験3-2】

< 等電点 >

実験2の方法で精製して得た  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を、



2 w/v % アンフォライン (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製造) 含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、電気泳動後の蛋白バンド及びゲルの pH を測定して当該酵素ポリペプチドの等電点を求めた。その結果、当該酵素の等電点は pI 約 4.3 ± 0.5 であった。

【0056】

【実験 3-3】

<作用温度及び pH>

$\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性に及ぼす温度と pH の影響について、各種温度、pH 条件下、実験 1 に記載の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性測定法に準じて調べた。その結果、至適温度は、pH 8.4、60 分間反応で、約 60℃ ( $\text{Ca}^{2+}$  非存在) 又は約 65℃ (1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在) で、その至適 pH は、35℃、60 分間反応で約 8.4 であった。

【0057】

【実験 3-4】

<安定性>

$\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性は、当該酵素含有溶液 (20 mM グリシン-NaOH 緩衝液、pH 8.0) を  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下または 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で各温度に 60 分間保持し、水冷した後、残存する  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を測定することにより求めた。又、pH 安定性は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を各 pH の 50 mM 緩衝液中で 4℃、24 時間保持した後、pH を 8.0 に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。その結果、温度安定性は約 55℃ まで ( $\text{Ca}^{2+}$  非存在) 又は約 60℃ まで (1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在) で、pH 安定性は約 5.0 乃至 9.0 であった。

【0058】

【実験 3-5】

<N 末端アミノ酸配列>

実験 2 の方法で精製して得た  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素について、その N 末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル 473A』 (

アプライドバイオシステムズ社製造)を用いて分析したところ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は配列表に於ける配列番号3に示すアミノ酸配列を有することが判明した。

#### 【0059】

以上、アルスロバクター・グロビホルミスA19株由来の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の調製方法及びその性質を示したが、本発明においては、他の菌株由来の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素であっても用いることができる。

#### 【0060】

##### 【実験4】

##### 〈L-アスコルビン酸への糖転移試験〉

以下に示す各種糖質が、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を用いる糖転移反応における糖供与体となり、L-アスコルビン酸へ糖転移するかどうかを試験した。すなわち、グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、イソマルトース、イソマルトトリオース、イソパノース、トレハロース、コージビオース、ニゲロース、ネオトレハロース、セロビオース、ゲンチビオース、マルクトール、マルトトリイトール、ラクトース、スクロース、エルロース、セラギノース、マルトシルグルコシド、イソマルトシルグルコシド、 $\alpha$ -シクロデキストリン、 $\beta$ -シクロデキストリン、 $\gamma$ -シクロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、グリコーゲン、プルラン、デキストランを含む溶液を調製した。それぞれ溶液にL-アスコルビン酸を加えて、糖質濃度及びL-アスコルビン酸濃度を2w/v%に調整した。これらの溶液に、実験2の方法で得た精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を糖質固形物1グラム当たりそれぞれ3単位ずつ加え、基質濃度を1.6w/v%になるように調整し、これらを40℃、pH6.0で20時間作用させた。酵素反応後の2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成を調べるため、シリカゲル薄層クロマトグラフィー(以下、TLCと略す。)を行なった。展開溶媒としてn-ブタノール、ピリジン、水混液(容量比6:4:1)、薄層プレートとしてメルク社製造『キーゼル

ゲル 60F254』(アルミプレート、20×20 cm)を用い1回展開した後、紫外線を薄層プレートに照射してアスコルビン酸及び2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸検出し、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸生成の有無を確認した。結果を表2に示す。

## 【0061】

【表2】

$\alpha$ -イソマルト シルグルコ糖 質生成酵素 (単位/g)	シクロマルトデキ ストリン・グルカ ノトランスフェラ ーゼ(CGTase) (単位/g)	生成量(%)		
		2-O- $\alpha$ -D-グ ルコピラノシル-L -アスコルビン酸	5-O- $\alpha$ -D-グ ルコピラノシル-L -アスコルビン酸	6-O- $\alpha$ -D-グ ルコピラノシル-L -アスコルビン酸
10	0	25.1	0.0	0.0
10	1	29.3	0.0	0.0
10	2	30.1	0.0	0.0
10	5	30.8	0.1	0.0
10	10	30.9	0.1	0.0
10	100	30.6	0.8	0.3
0	1	4.3	0.0	0.0
0	2	5.4	0.0	0.0
0	5	7.8	0.2	0.0
0	10	10.4	0.3	0.1
0	100	29.5	0.9	0.3

## 【0062】

表2の結果から明らかなように、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、試験した各種糖質の内、グルコース重合度が3以上で、非還元末端にマルトース構造を有する糖質を糖供与体として、L-アスコルビン酸に糖転移し、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成することが判明した。又、グルコース重合度が2の糖質では、マルトース、コージビオース、ニゲロース、ネオトレハロース、マルトトリイトール、エルロースにも作用し2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成することが判明した。

## 【0063】

## 【実験5】

〈L-アスコルビン酸への糖転移生成物〉

L-アスコルビン酸を濃度5 w/v%、マルトペンタオースを濃度5 w/v%、及び1 mMの塩化カルシウムを含む水溶液をpH 5.0に調整し、これに実験

2の方法で調製した精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素をマルトペンタオース1 g当たり10単位になるように加えて50℃で24時間反応させ、その反応液を10分間煮沸して反応を停止させた後、その反応液の一部を採り、それにグルコアミラーゼ（生化学工業株式会社製造）をマルトペンタオース1 g当たり40単位加え、40℃で16時間作用させた後、10分間煮沸して反応を停止させた。これら反応液中のL-アスコルビン酸への糖転移生成物及び残存するL-アスコルビン酸を、以下の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法で分離し測定した。『Wakopak WB-T-330カラム』（和光純薬工業株式会社製造）を用い、カラム温度25℃、溶離液として70 ppm硝酸水溶液の流速0.5 ml/minの条件で行い、検出は、アスコルビン酸及びアスコルビン酸への糖転移物を分光光度計『UV-8020』（東ソー株式会社製造）を用いて波長238 nm吸収で測定するとともに、アスコルビン酸及びアスコルビン酸への糖転移物を含めた全組成を示差屈折計『RI-8020』（東ソー株式会社製造）を用いて測定することで行ない、アスコルビン酸及びアスコルビン酸への糖転移物の反応液固形物当りの生成量（以下、本明細書では、特に断らない限り、生成量は反応液固形物当りの生成量を意味する。）を求めた。それらの結果を表3に示す。

【0064】

【表3】

グルコアミラーゼ反応の有無	生成量(%)		
	2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸	2-O- $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸*	L-アスコルビン酸
無	18.7	0.4	40.3
有	19.1	0.0	40.3

\*: 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸に $\alpha$ -D-グルコピラノシル残基が更に1個又は2個以上付加したものを意味する。

【0065】

表3の結果から明らかなように、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素によ

る L-アスコルビン酸への糖転移生成物として、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸が約 18.7% 生成するとともに、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸とは異なる転移生成物が約 0.4% 生成することがわかった。また、この反応液にグルコアミラーゼを作用させると、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸とは異なる転移生成物は消失し、その消失とともに 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸量が増加し、L-アスコルビン酸への糖転移生成物として、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸のみが生成することが判明した。グルコアミラーゼの作用特性を考慮すると、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸とは異なる転移生成物は、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸に  $\alpha$ -D-グルコピラノシル残基が更に 1 個又は 2 個以上付加した 2-O- $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸であり、グルコアミラーゼ作用の結果、この 2-O- $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸の 1 個又は 2 個以上付加した  $\alpha$ -D-グルコピラノシル残基が加水分解され、2-O- $\alpha$ -グリコシル-L-アスコルビン酸が 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸に変換されたと判断される。

#### 【0066】

##### 【実験6】

〈2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸生成の作用温度及び pH〉

$\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸生成活性に及ぼす温度と pH の影響について、各種温度、pH 条件下で調べた。2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸生成活性測定は、次のようにして測定した。

(1) 温度の影響については、L-アスコルビン酸を濃度 0.5 w/v %、マルトペンタオースを濃度 0.5 w/v %、及び塩化カルシウムを濃度 1 mM となるように 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解させ基質液とし、その基質液 2 ml に酵素液 0.2 ml 加えて、30 乃至 65℃ で 30 分間酵素反応し、その反応液を 10 分間煮沸して反応を停止させた。その反応液中に生成した 2-O-

$\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸量は、実験5に記載のHPLC法により分離し測定することによって行った。

(2) pHの影響については、L-アスコルビン酸を濃度0.5 w/v%、マルトペンタオースを濃度0.5 w/v%、及び塩化カルシウムを濃度1 mMとなるように100 mMの各種緩衝液に溶解させ基質液とした。緩衝液の種類は、pH 4.1乃至6.4の範囲では酢酸緩衝液を用い、pH 6.7乃至7.5の範囲ではリン酸緩衝液を用い、pH 7.6乃至8.5の範囲ではトリス・塩酸緩衝液を用いた。その基質液2 mlに酵素液0.2 ml加えて、40℃で30分間酵素反応し、その反応液を10分間煮沸して反応を停止させた後、その反応液中に生成した2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸量をHPLC法で定量することによって行った。それらの結果を図1（温度の影響）及び図2（pHの影響）に示した。

#### 【0067】

図1から明らかなように、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸生成活性の至適温度は、pH 5.0、30分間反応で、約55乃至60℃であった。また、図2から明らかなように、その至適pHは、40℃、30分間反応で約5.5であった。

#### 【0068】

##### 【実験7】

〈2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸生成〉

L-アスコルビン酸を5%、澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#1』、松谷化学株式会社製造）を5%及び1 mMの塩化カルシウムを含む水溶液をpH 5.0に調整し、これに実験2の方法で調製した精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を澱粉部分分解物1 g当たり5乃至20単位になるように加えて50℃で48時間反応させた。これら反応液を約100℃で10分間加熱し、酵素を失活させた後、40℃に冷却し、グルコアミラーゼ（生化学工業株式会社製造）を澱粉部分分解物1 g当たり40単位加え、40℃で16時間作用させた。これら反応液を実験5に記載のHPLC法に供し、標準品として、市販の2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸（株式会社林原生物化学研究

所製造)、特許第3134235号明細書に記載の方法で調製した5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を用いて、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸、及び5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸、6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を分離し、それぞれの生成量を測定し、基質固形物当りの生成率を求めた。対照として、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の代わりに、バチルス・ステアロサーモフィルス由来のCGTase(株式会社林原生物化学研究所製造)を澱粉部分分解物1g当り300単位用いた以外、同じ操作を行い、同様に、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸、及び5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸、6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成量を調べた。それらの結果を表4に示す。

【0069】

【表4】

酵 素	酵素量 (単位/g)	生成量(%)		
		2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸	5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸	6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸
アルスロバクター属由来 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素	5	22.5	0.0	0.0
	10	24.0	0.0	0.0
	20	24.3	0.0	0.0
シクロマルトデキストリン・トランスグルカナーゼ (CGTase: 対照)	300	25.5	0.8	0.3

【0070】

表4の結果から明らかなように、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、アスコルビン酸への転移物として2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸のみを生成し、他の5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成されなかった。一方、対照のCGTaseは、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成

酵素とはほぼ同じの 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸生成量であったが、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び 6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成量は、それぞれ、0.8%、0.3%であった。

#### 【0071】

以上の結果から、CGTase のアスコルビン酸への糖転移は、アスコルビン酸の 2 位水酸基だけでなく、5 位及び 6 位水酸基にも転移し、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成するとともに、副生成物として 5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び 6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成するのに対して、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のアスコルビン酸への糖転移は、アスコルビン酸の 2 位水酸基のみに反応し、特異的に 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成することが判明した。

#### 【0072】

##### 【実験 8】

##### 〈CGTase との併用試験〉

L-アスコルビン酸を 9%、澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#100』、松谷化学株式会社製造）を 21% 及び 1mM の塩化カルシウムを含む水溶液を pH 5.0 に調整し、これに実験 2 の方法で調製した精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を澱粉部分分解物 1g 当たり 10 単位、CGTase（株式会社林原生物化学研究所製造）を 1 乃至 100 単位になるように加えて 50℃ で 24 時間反応させた。これら反応液を約 100℃ で 10 分間加熱し、酵素を失活させた後、40℃ に冷却し、グルコアミラーゼ（生化学工業株式会社製造）を澱粉部分分解物 1g 当たり 40 単位加え、40℃ で 16 時間作用させた。これら反応液を実験 5 に記載の HPLC 法に供し、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸、及び 5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸、6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成量を測定し、基質固形物当りの生成量を求めた。併せて、精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素単独及び対照として、CGTase 単独で転移反応を行い同様に



操作した。それらの結果を表5に示す。

【0073】

【表5】

$\alpha$ -イソマルト シルグルコ糖 質生成酵素 (単位/g)	シクロマルトデ キストリン・トラ ンスグルカナ ゼ (CGTase) (単位/g)	生成量(%)		
		2-O- $\alpha$ -D-グ ルコピラノシル- L-アスコルビン酸	5-O- $\alpha$ -D-グ ルコピラノシル- L-アスコルビン酸	6-O- $\alpha$ -D-グ ルコピラノシル- L-アスコルビン酸
10	0	25.1	0.0	0.0
10	1	29.3	0.0	0.0
10	2	30.1	0.0	0.0
10	5	30.8	0.1	0.0
10	10	30.9	0.1	0.0
10	100	30.6	0.8	0.3
0	1	4.3	0.0	0.0
0	2	5.4	0.0	0.0
0	5	7.8	0.2	0.0
0	10	10.4	0.3	0.1
0	100	29.5	0.9	0.3

【0074】

表5の結果から明らかなように、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素単独の場合は、上記の実験7の結果と同様に、アスコルビン酸への転移物として2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸のみを約25%生成量で生成し、他の5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成は検出されなかった。 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とCGTaseとを併用した場合は、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成が増加し、約29乃至31%の生成量で、併用するCGTaseの使用量が1乃至2単位/gでは5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成は検出されず、併用するCGTaseの使用量が5乃至10単位/gでは5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成が約0.1%の生成量で検出され、併用するCGTaseの使用量が100単位/gでは5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成が、それぞれ0.8%及び0.1%の生成量で検出された。対照のCGTase

単独の場合、その使用量が1乃至2単位/gでは、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成は検出されないものの、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成量は約4乃至5%と少量で、また、CGTase単独の使用量が5単位/g以上の場合では、その使用量の増加とともに2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成量が約8%から約30%に上昇するものの、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び/又は6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸が生成することがわかった。

#### 【0075】

以上の結果から、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び/又は6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成が無い若しくは検出できない使用量のCGTaseを、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と併用することによって、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成率を $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素単独使用の場合より増加させ、且つ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素単独使用の場合と同様に、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び/又は6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の生成が無い若しくは検出できないほどの極微量であることが判明した。

#### 【0076】

以下、本発明の2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有物の製造方法についての実施例を述べる。

#### 【0077】

##### 【実施例1】

デキストリン（DE約6）9重量部を水28重量部に加熱溶解し、還元下に保って、L-アスコルビン酸3重量部を加え、pH5.0、50℃に維持しつつ、これに実験2の方法で調製した $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する部分精製酵素標品をデキストリン1グラム当たり8単位加えて42時間反応させた。次に、反応液を加熱して酵素を失活させた後、55℃に調整し、これにグ

ルコアミラーゼをデキストリン 1 g 当り 50 単位加えて、16 時間反応させた。

【0078】

反応液を HPLC で分析したところ、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を固形物当り約 24.9% 含有しており、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び 6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸は検出されなかった。さらに、本反応液を加熱して酵素を失活させ、活性炭で脱色濾過し、濾液をカチオン交換樹脂 (H<sup>+</sup>型) のカラムにかけ脱ミネラルし、次いで、アニオン交換樹脂 (OH<sup>-</sup>型) のカラムにかけアニオンを樹脂に吸着させ、水洗して D-グルコースなどを除去後、0.5 規定塩酸溶液で溶出、濃縮した。

【0079】

濃縮液を HPLC で分析したところ、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を固形物当り約 52.5%、L-アスコルビン酸を固形物当り約 39% 含有しており、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び 6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸は 0.1% 未満であった。本濃縮液を原料溶液として、強酸性カチオン交換樹脂 (ローム & ハース社製造、商品名『アンバーライト CG-6000』、H<sup>+</sup>型) を充填したカラムクロマトグラフィーを行い、この溶出液の 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有画分を採取した。

【0080】

本画分を HPLC で分析したところ、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を固形物当り約 93.6% 含有しており、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び 6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸は 0.1% 未満であった。本画分を減圧濃縮して濃度約 77% とし、これを助晶缶にとり、結晶 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を種晶として 2% 加えて 40℃ とし、ゆっくり攪拌しつつ、徐冷して 2 日間を要して 20℃ まで下げ、更にバスケット型遠心分離機にかけ、結晶-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を原料の L-アスコルビン酸に対して収率約 46% で得た。また、母液として、2-O- $\alpha$ -D-グルコピ

ラノシルーL-アスコルビン酸を固形物当り約82.3%含有する溶液を原料のL-アスコルビン酸に対して固形物収率約28%で回収した。

#### 【0081】

本結晶2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルーL-アスコルビン酸品は、直接還元性をしめさず、安定性、生理活性も充分で、ビタミンC強化剤としてばかりでなく、呈味改善剤、酸味剤、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生理活性剤、紫外線吸収剤、医薬原料、化学品などとして、飲食物、抗感受性疾患剤、化粧品などに有利に利用できる。

#### 【0082】

##### 【実施例2】

実施例1の方法で回収した母液を濃縮後、実施例2の方法に準じて、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーを行い、この溶出液の2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルーL-アスコルビン酸高含有画分を採取した。本画分をHPLCで分析したところ、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルーL-アスコルビン酸を固形物当り約93.0%含有しており、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルーL-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルーL-アスコルビン酸は0.1%未満であった。さらに、本画分を、実施例1の方法に準じて、濃縮、晶出、分蜜し、結晶2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルーL-アスコルビン酸を母液固形物当り収率約63%で得た。

#### 【0083】

本品は、実施例1の場合と同様に、飲食物、抗感受性疾患剤、化粧品などに有利に利用できる。

#### 【0084】

##### 【実施例3】

アルスロバクター・グロビホルミスA19株(FERM BP-7590)を常法に従って、変異剤としてニトロソグアニジンを用いて変異させ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素高生産且つ $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素非生産株を取得した。この変異株を、実験1の方法に準じて、澱粉部分分解物『パインデックス#4』4.0%(w/v)、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8%(w/v)

v)、リン酸二カリウム 0.1% (w/v)、リン酸一ナトリウム・12水塩 0.06% (w/v)、硫酸マグネシウム・7水塩 0.05% (w/v)、及び水からなる液体培地で 72 時間通気攪拌培養した。培養後、培養液中の酵素活性を測定したところ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約 14 単位/ml で、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は検出されなかった。得られた培養液を、常法に従って、SF 膜で除菌し、UF 膜で濃縮し、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する濃縮液を得た。得られた濃縮液の酵素活性を測定したところ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約 350 単位/ml であった。

#### 【0085】

とうもろこし澱粉を濃度約 20% の澱粉乳とし、これに炭酸カルシウム 0.1% 加え、pH 6.5 に調整し、 $\alpha$ -アミラーゼ（商品名『ターマミール 60L』、ノボ社製造）を澱粉グラム当たり 0.3% 加え、95℃ で 15 分間反応させ、次いで 120℃ に 20 分間オートクレーブし、更に約 53℃ に急冷して DE 約 4 の液化溶液を得、この液化溶液 88 重量部に L-アスコルビン酸 12 重量部を加え、pH 5.0、53℃ に維持しつつ、これに上記の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する濃縮液をデキストリン 1 グラム当たり 10 単位と CGTase（株式会社林原生物化学研究所製造）をデキストリン 1 グラム当たり 1 単位加えて 36 時間反応させた。

#### 【0086】

反応液を加熱して酵素を失活させた後、55℃ に調整し、これにグルコアミラーゼをデキストリン 1 g 当たり 50 単位加えて、16 時間反応させた。反応液を HPLC で分析したところ、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を固形物当たり約 33.5% 含有しており、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び 6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸は検出されなかった。

#### 【0087】

本反応液を加熱して酵素を失活させ、活性炭で脱色濾過し、濾液をカチオン交換樹脂（H<sup>+</sup>型）のカラムにかけ脱ミネラルし、次いで、アニオン交換樹脂（O

H<sup>-</sup>型)のカラムにかけアニオンを樹脂に吸着させ、水洗してD-グルコースなどを除去後、0.5規定塩酸溶液で溶出、濃縮し、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を固形物当り約56.1%含有する濃縮液を得た。

#### 【0088】

本濃縮液を原料溶液として、実施例1の方法に準じて強酸性カチオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーを行い、この溶出液の2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有画分を採取し、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を固形物当り約96.4%含有する2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有画分を得た。

#### 【0089】

本画分を減圧濃縮して濃度約77%とし、これを助晶缶にとり、結晶2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を種晶として1%加えて40℃とし、ゆっくり攪拌しつつ、徐冷して2日間を要して20℃まで下げ、更にバスケット型遠心分離機にかけ、1番晶結晶として2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を原料のL-アスコルビン酸に対して固形物収率約48%で得た。また、母液として、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を固形物当り約86.7%含有する溶液を原料のL-アスコルビン酸に対して固形物収率約26%で回収した。

#### 【0090】

得られた母液を、活性炭で脱色濾過し、濃縮して、実施例2の方法に準じて、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーを行い、この溶出液の2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有画分を採取した。

#### 【0091】

本画分をHPLCで分析したところ、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を固形物当り約96.3%含有しており、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸は0.1%未満であった。

## 【0092】

本画分を、実施例1の方法に準じて、濃縮、晶出、分蜜し、2番晶結晶として2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を母液固形物当り収率約65%で得た。

## 【0093】

上記の方法で得られた1番晶及び2番晶の結晶2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸をそれぞれ乾燥し、混合して粉碎して、純度99%以上の結晶2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸粉末を原料のL-アスコルビン酸に対して固形物収率約60%で得た。

## 【0094】

本品は、直接還元性をしめさず、安定性、生理活性も充分で、ビタミンC強化剤としてばかりでなく、呈味改善剤、酸味剤、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生理活性剤、紫外線吸収剤、医薬原料、化学品などとして、飲食物、抗感受性疾患剤、化粧品などに有利に利用できる。

## 【0095】

## 【実施例4】

国際公開番号WO02/10361号明細書に記載の方法に準じて、澱粉部分分解物『パインデックス#4』4.0% (w/v)、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8% (w/v)、リン酸二カリウム0.1% (w/v)、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06% (w/v)、硫酸マグネシウム・7水塩0.05% (w/v)、及び水からなる液体培地を用いて、バチルス・グロビスポルス C11株 (FERM BP-7144) を48時間通気攪拌培養し、遠心分離 (10,000 rpm、30分間) して回収した培養上清を80%飽和硫酸液で塩析し、透析した後、『セファビーズ (Sepabeads) FP-DA13』ゲル (三菱化学株式会社製造) を用いたイオン交換クロマトグラフィー、続いて、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲル (アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製造) を用いたアフィニティークロマトグラフィー、更に『ブチルートヨパール (Butyl-Toyoppearl) 650M』ゲル (東ソー株式会社製造) を用いた疎水クロマトグラフィー、再度『セファクリル (

Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を約2,000単位有する精製酵素標品を得た。

#### 【0096】

デキストリン (DE約6) 6重量部を水30重量部に加熱溶解し、還元下に保って、L-アスコルビン酸4重量部を加え、pH5.0、40℃に維持しつつ、これに上記の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する精製酵素標品をデキストリン1グラム当り1単位とCGTase (株式会社林原生物化学研究所製造) をデキストリン1グラム当り2単位加えて24時間反応させた。反応液を加熱して酵素を失活させた後、55℃に調整し、これにグルコアミラーゼをデキストリン1g当り50単位加えて、16時間反応させた。この反応液を加熱して酵素を失活させ、活性炭で脱色濾過し、濾液を得た

#### 【0097】

濾液をHPLCで分析したところ、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を固形物当り約10.2%含有しており、5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸は検出されなかった。

#### 【0098】

濾液をカチオン交換樹脂 (H<sup>+</sup>型) のカラムにかけ脱ミネラルし、次いで、アニオン交換樹脂 (OH<sup>-</sup>型) のカラムにかけアニオンを樹脂に吸着させ、水洗してD-グルコースなどを除去後、0.5規定塩酸溶液で溶出、濃縮し、実施例1の方法に準じて強酸性カチオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーを行い、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸高含有画分を採取し、減圧濃縮して濃度約77%とし、これを助晶缶にとり、結晶2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を種晶として2%加えて40℃とし、ゆっくり攪拌しつつ、徐冷して2日間を要して20℃まで下げ、更にバスケット型遠心分離機にかけ、純度98%以上の結晶2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を原料のL-アスコルビン酸に対して固形物収率約11%で得た。



## 【0099】

本品は、直接還元性をしめさず、安定性、生理活性も充分で、ビタミンC強化剤としてばかりでなく、呈味改善剤、酸味剤、安定剤、品質改良剤、抗酸化剤、生理活性剤、紫外線吸収剤、医薬原料、化学品などとして、飲食物、抗感受性疾患剤、化粧品などに有利に利用できる。

## 【0100】

## 【発明の効果】

以上説明したように、本発明は、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造方法に関し、より詳細には、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を用いて、又は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼとを併用して、L-アスコルビン酸に糖転移反応させ、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成せしめる反応を利用した2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造方法に関する発明である。斯かる本発明によれば、糖転移物中には、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の結合異性体である5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸が生成していないか若しくはそれらの生成が検出できないほど少なく、糖転移物から2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を採取する工程において、これら結合異性体の悪影響を受けることなく有利に2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を採取することができる。斯かる本発明によれば、斯界に於いて有用な2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を工業的に大量かつ安価に高収率で製造し得る。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> A method for producing 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid

<130> 10095901

<160> 3

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> *Arthrobacter globiformis*

<400> 1

Tyr Val Ser Ser Leu Gly Asn Leu Ile

1

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> *Arthrobacter globiformis*

<400> 2

His Val Ser Ala Leu Gly Asn Leu Leu

1

5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> *Arthrobacter globiformis*

<400> 2

Ala Pro Leu Gly Val Gln Arg Ala Gln Phe Gln Ser Gly

1

5

10

【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

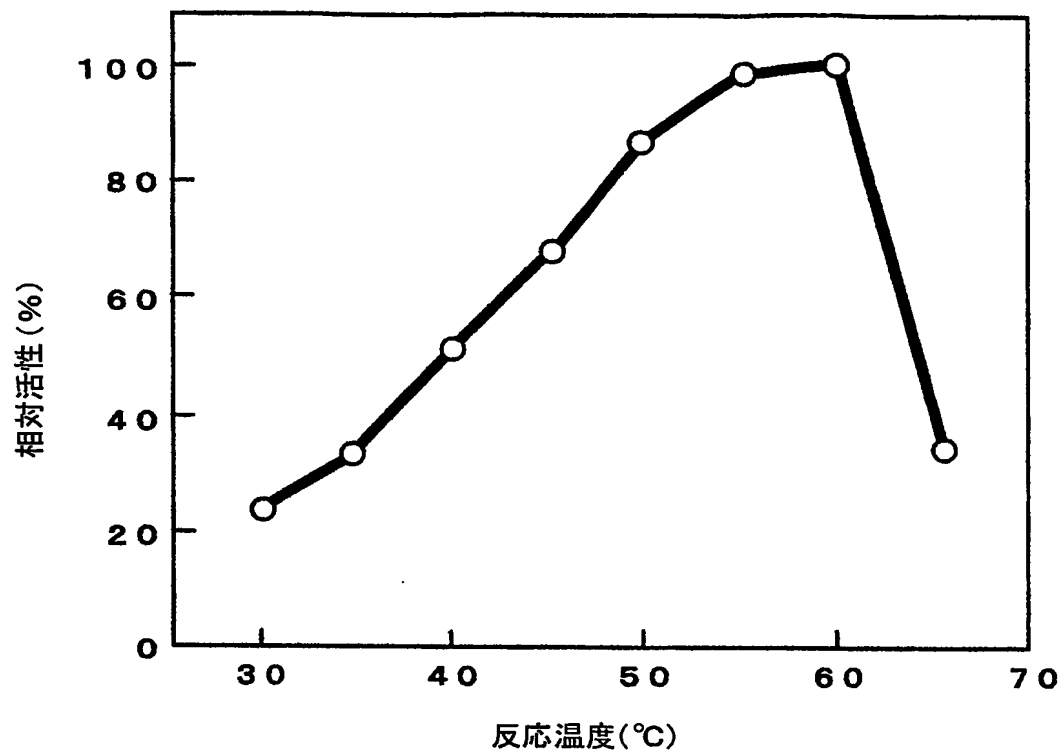
アルスロバクター・グロビホルミス A19 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸生成活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

## 【図 2】

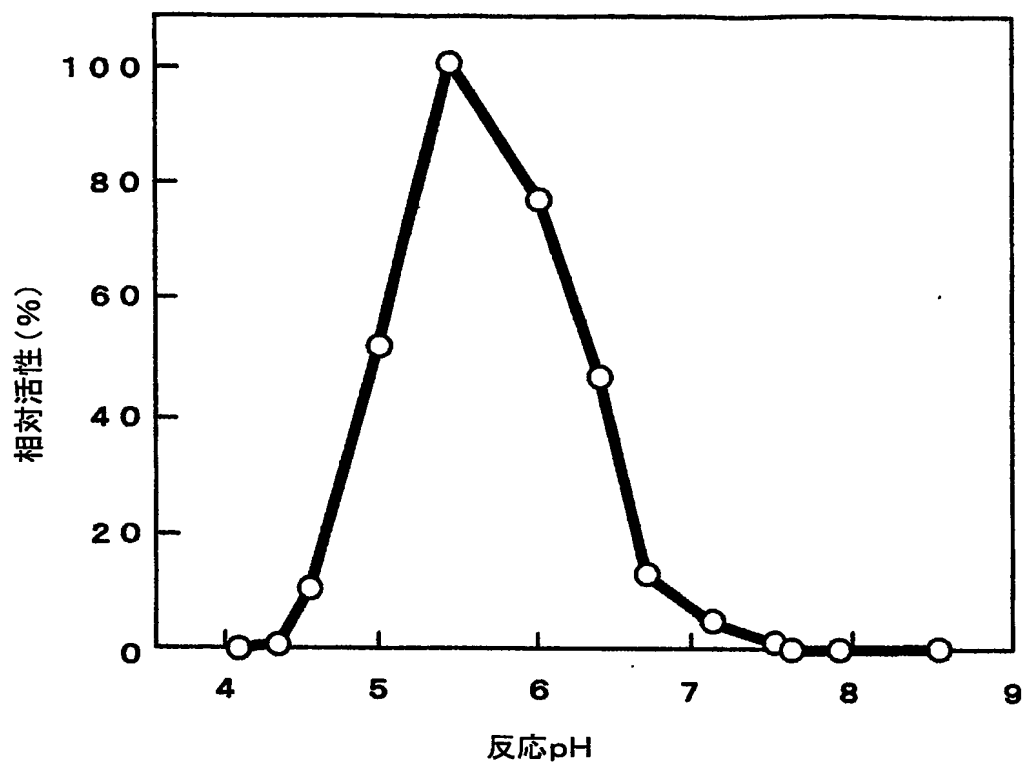
アルスロバクター・グロビホルミス A19 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の 2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸生成活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 5-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸及び6-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成しないか若しくはそれらの生成が検出できないほど少ない2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸反応方法を提供するとともに本反応方法を用いた2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造方法を提供するものである。

【課題の解決手段】 L-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素または $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ（EC 2.4.1.19）とを作用させ、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸を生成せしめ、これを採取することを特徴とする2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-L-アスコルビン酸の製造方法を提供することで課題を解決する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-228705
受付番号	50201165968
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 8月 7日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 8月 6日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 2 - 2 2 8 7 0 5

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[ 0 0 0 1 5 5 9 0 8 ]

- |          |                       |
|----------|-----------------------|
| 1. 変更年月日 | 1 9 9 0 年 8 月 3 1 日   |
| [変更理由]   | 新規登録                  |
| 住 所      | 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号      |
| 氏 名      | 株式会社林原生物化学研究所         |
|          |                       |
| 2. 変更年月日 | 1 9 9 8 年 1 0 月 2 1 日 |
| [変更理由]   | 住所変更                  |
| 住 所      | 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号      |
| 氏 名      | 株式会社林原生物化学研究所         |